Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Beziehungen zwischen physikalischen und biologischen Größen und Überlebensraten von Bakterien bei der Gefriertrocknung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hannelore Siebold
aus Leipzig

1964

7817

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Beziehungen zwischen physikalischen und biologischen Größen und Überlebensraten von Bakterien bei der Gefriertrocknung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hannelore Siebold
aus Leipzig

1964

Dekan: Professor Dr. Dr. E. FRÖHLICH
Referent: Privatdozent Dr. D. JACHERTS
Korreferent: Professor Dr. R.-E. BADER

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
LITERATURÜBERSICHT	4
PROBLEMSTELLUNG	12
EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
A. Material	13
B. Methoden	14
C. Ergebnisse	18
DISKUSSION	30
ZUSAMMENFASSUNG	33
LITERATURVERZEICHNIS	34

Lebenslauf

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547602_0054

I EINLEITUNG

Biologische Stoffe sind wegen ihres Gehaltes an Eiweiß und Wasser gegenüber Umwelteinflüssen wie Sauerstoff, Licht und Austrocknung sehr empfindlich. Es ist deshalb nicht möglich, sie über längere Zeit ohne besondere Vorkehrungen aufzubewahren. Man kann aber biologische Stoffe durch Entfernung des Wassers haltbarer machen. Es sind im Laufe der Zeit verschiedene Verfahren der Konservierung durch Trocknung entwickelt worden; zu ihnen gehört auch die sog. Gefriertrocknung, welche neuerdings immer mehr an Bedeutung gewonnen hat.

Gefriertrocknung bedeutet Wasserentzug aus gefrorenem Material. Dadurch unterscheidet sie sich von der einfachen Trocknung aus nativem Zustand. Der entscheidende Vorgang bei der Gefriertrocknung ist die Sublimation des in dem eingefrorenen Trockengut enthaltenen Eises. Zum Abtransport des absublimierten Wasserdampfes muß ein wirksames Druckgefälle vom Trockengut zur Umgebung aufrechterhalten werden. Dies wird erreicht, wenn der gebildete Wasserdampf ständig eliminiert wird. Der Wasserdampfpartialdruck über dem Trokkengut hängt von der im Trockengut herrschenden Temperatur, von der Oberflächenbeschaffenheit des Trockengutes und von der chemischen und physikalischen Bindung des Wassers im Innern des Trockengutes ab. Um einen schnellen Abtransport des Wasserdampfes zu erreichen, ist man bestrebt, den Wasserdampfpartialdruck über dem Trockengut möglichst hoch zu erhalten. Das ist wiederum nur möglich, wenn auch die Temperatur im Trockengut möglichst hoch bleibt. Andererseits muß sie aber noch unterhalb einer gewissen kritischen Grenze liegen, welche durch den Salzgehalt des Trockengutes bestimmt wird. Diese Grenze nennt man den eutektischen Punkt. - Wird eine Salzlösung abgekühlt, so bilden sich zunächst aus dem freien Wasser Eiskristalle, während die Salzlösung eine Konzentrierung erfährt. Es wird alsbald ein Zustand erreicht, bei dem sich ein Film hochkonzentrierter Salzlösung zwischen den Eiskristallen befindet. Gefriert bei weiterer Abkühlung schließlich auch dieser Flüssigkeitsfilm, so ist der eutektische Punkt der Salzlösung erreicht. -

Überschreitet die Temperatur im Trockengut während der Trocknung diesen eutektischen Punkt, so kommt es im Innern des Trockengutes zur Verflüssigung des Eises und damit zur Schädigung der empfindlichen Substanzen (Neumann 1955).

Für die Eliminierung des Wasserdampfes bei der Gefriertrocknung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die wichtigsten sind:

1) Absorption des Wasserdampfes durch chemische Absorptionsmittel wie $CaCl_2$, P_2O_5, konz. H_2SO_4 u.a.
2) Ausfrieren des Wasserdampfes an tiefgekühlten Flächen.
3) Absaugen des Wasserdampfes durch Pumpen.

Heute wählt man fast ausschließlich das dritte Verfahren, bei dem die Pumpen meist mit einem Eiskondensator kombiniert sind, an welchem die abgesaugten Dämpfe ausgefroren werden.

Die neueren Konstruktionen der Gefriertrocknungsanlagen bestehen aus einem System hintereinandergeschalteter Pumpen von verschiedener Leistungsfähigkeit und einem Eiskondensator, meist in Form einer Kühlfalle. Diese ist zwischen Trockengut und Pumpensystem eingeschaltet. Durch die Kombination einer rotierenden Ölpumpe und einer Diffusionspumpe, wie sie z.B. in der Gefriertrocknungsanlage G 01 von Leybold/Köln vorliegt, können Vakuumbereiche bis zu 10^{-5} Torr[1] erreicht werden. Der abgepumpte Wasserdampf schlägt sich in der Kühlfalle nieder, sodaß die Pumpen möglichst keinen Wasserdampf fördern müssen.

Das Trockengut kann je nach Art in Einzelampullen, in mehreren Ampullen am Trockenrechen oder aber in einer Trockenkammer getrocknet werden.

Die Gefriertrocknung wird heute zur Konservierung einer großen Anzahl von Stoffen angewandt. Blutplasma, Seren und Milch sind verhältnismäßig einfach zu trocknen. Aber schon die Trocknung von Impfstoffen, Medikamenten und Nahrungsmitteln bereitet Schwierigkeiten, weil man mit dem Verlust der Wirksamkeit bei Impfstoffen und Medikamenten bzw. des Aromas bei Lebensmitteln rechnen muß. Die Trocknung von Medikamenten und Nahrungsmitteln steht noch ganz am Anfang der Entwicklung. Immerhin weiß man, daß für die Erhaltung des Aromas in getrockneten Nahrungsmitteln die Restfeuchtigkeit eine wichtige Rolle spielt (Neumann 1955). Am weitaus schwierigsten gestaltet sich je-

---

1) 1 Torr = 1 mm Hg

doch die Trocknung von histologischen Präparaten und vor allem von lebendem Material - wie Protozoen, Bakterien und Viren - die leider fast nie ohne wesentliche Verluste durchgeführt werden kann. Auch chirurgisches Implantationsmaterial - nämlich Knochen, Gefäße und Nerven - kann lyophilisiert werden. Es kommt darauf an, daß das Material keimfrei ist und die Restfeuchtigkeit nach der Trocknung unter 1 % liegt (Neumann 1955).

Der Vorteil der Gefriertrocknung gegenüber der einfachen Trocknung aus nativem Zustand liegt in der schonenden Art des Wasserentzuges, wodurch Veränderungen an den Proteinen im Sinne einer Denaturierung vermieden werden: die kolloide Dispersion im Trockengut bleibt erhalten. Gefriergetrocknete Substanzen können außerdem bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden; das bedeutet auch die Möglichkeit, derartiges Material über größere Strecken zu versenden. Bakterielles Wachstum und enzymatische Veränderungen sind während und nach der Trocknung unmöglich. - Für die Bakteriologie bietet die Gefriertrocknung noch besondere Vorteile: Wenn die Aufbewahrung von Bakterienstämmen in lyophilisiertem Zustand erfolgen kann, entfällt das regelmäßige Überimpfen der Stämme und damit auch die ungewollte Selektion von Mutanten (Neumann 1955). Tierpassagen werden überflüssig, weil die Eigenschaften der lyophilisierten Bakterien bis auf wenige Ausnahmen erhalten bleiben (Frasquelle und Barbier 1950). Für die routinemäßige Anwendung der Lyophilisation ist jedoch von Nachteil, daß der Prozeß mit einem relativ großen Aufwand an Zeit und Apparaturen verknüpft ist. Wahrscheinlich reichen die Erfahrungen auf diesem Gebiet noch nicht aus, um das Verfahren in breitem Umfang anzuwenden.

II LITERATURÜBERSICHT

Über die ersten Anfänge der Gefriertrocknung zur Lösung biologischer Aufgaben liegen bereits aus dem Jahre 1890 Berichte von dem Leipziger Anatomen Altmann vor (Neumann 1955). Seitdem befaßten sich Forscher verschiedener Fachrichtungen mit dieser Konservierungsmethode und wandten sie auf ihren Gebieten an. Auch in die Mikrobiologie hat diese Methode Eingang gefunden und ist auf ihre Verwendbarkeit für die einzelnen Arten von Mikroorganismen untersucht worden. Inzwischen ist es gelungen, eine große Anzahl von Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, durch Gefriertrocknung zu konservieren.

So berichtet Moreau (1952) von der erfolgreichen Lyophilisierung von 500 Anaerobierstämmen, deren biologische, chemische, serologische, toxische und pathologische Eigenschaften mit wenigen Ausnahmen erhalten blieben. Nur wenige Typen von Clostridium botulinum verloren ihre Toxinbildungsfähigkeit. Leider fehlen Zahlenwerte von den Überlebensraten unmittelbar nach der Trocknung. Es wird nur konstatiert, daß überhaupt Keime den Prozeß überlebten.

Auch Frasquelle und Barbier (1950) berichten über die Gefriertrocknung verschiedener Keime. Außer Viren trockneten sie Staphylokokken, Pneumokokke Streptokokken und andere, darunter auch gramnegative Bakterien. Dabei beobachteten sie, daß keine Veränderung der biologischen und biochemischen Eigenschaften stattfand.

Sogar empfindliche Keime - wie Brucella abortus (Bergmann/ Halleck/ Mechalas / Tenney 1957) und Neisseria gonorrhoeae (Fry und Greaves 1951 ,Proom 1952) konnten durch Gefriertrocknung konserviert werden, wenn auch nur mit niedriger Überlebensrate. Stavitsky (1945) gelang die Konservierung von Leptospira icterohaemorrhagiae durch Lyophilisieren nicht.

Die verschiedenen Keime zeigen also eine recht unterschiedliche Widerstandsfähigkeit gegenüber der Gefriertrocknung, ja man findet sogar innerhalb einer Gattung bei den einzelnen Typen ein verschiedenartiges Verhalten in der Lebensfähigkeit, wie das Stillmann (1941) von seinen Gefriertrocknungs-Versuchen mit Pneumokokken berichtet. Dasselbe beobachteten Record und Taylor (1953) bei Versuchen mit Escherichia coli, wobei unter gleichen Bedingungen mit verschiedenen Stämmen verschiedene Überlebensraten erreicht

wurden.

Die Gefriertrocknung gliedert sich in zwei Hauptabschnitte: Das Einfrieren und die Trocknung im Vakuum. Bei diesen Manipulationen werden die Keime schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Von dem Milieu, in dem sie sich dabei befinden - also der Schutzlösung oder irgendeinem anderen Suspensionsmedium - und von ihrer Widerstandsfähigkeit hängt es ab, ob sie trotz dieser Schädigung den Prozeß überstehen. Wenn man von den Schutzlösungen absieht, deren Wirkungsweise noch nicht bis ins einzelne geklärt ist, die aber einen deutlichen Schutz für die Keime bedeuten, kann auf die naturgegebene Empfindlichkeit der Keime gegenüber den unphysiologischen Bedingungen bei der Gefriertrocknung kein weiterer Einfluß genommen werden. Es gilt daher, einerseits die Keime in eine Verfassung zu bringen, in der ihre Widerstandskraft besonders hoch ist, andererseits die physikalischen Bedingungen so zu wählen, daß ihr schädigender Einfluß möglichst gering ist.

Da die Gefriertrocknung in der Regel mit dem Einfrieren beginnt, erhebt sich zunächst die Frage, wie schnell und bis zu welcher Temperatur eine Keimsuspension abgekühlt werden soll. Durch die Arbeiten von Meyer (1900), Macfadyen (1901), Ravanel (1900) u.a. weiß man, daß Bakterien durch sehr tiefe Temperaturen - wie z.B. die der flüssigen Luft - nicht abgetötet werden. Wie hoch dabei der Keimverlust war, wurde von den genannten Autoren nicht untersucht. Park (1901) prüfte das Verhalten von Salmonella typhi, Staphylokokken, Heubazillen und Escherichia coli in wäßriger Lösung bei - 5° C und bei - 185° C. Nach zweistündigem Aufenthalt der Keime bei - 185° C fand er noch eine Überlebensrate von 3 % bei Salmonella typhi, 5,5 % bei Escherichia coli, 27 % bei Staphylococcus aureus und 55 % bei Bacillus subtilis. Daraus folgt, daß jede Bakterienspezies durch den Einfriervorgang verschieden stark geschädigt wird.

Je nach der Einfriergeschwindigkeit kann es in einer Keimaufschwemmung - wie in einer verdünnten Salzlösung - zur Eiskristallbildung oder auch zur Bildung amorphen Eises kommen. Bei langsamem Einfrieren, d.h. bei einem Temperaturabfall von etwa 1°/min, können sich relativ große Kristalle bilden. Aus der Umgebung des Kristallkernes wird dabei Wasser herausgezogen, und es kommt in diesem Gebiet zu einer Konzentrierung der gelösten Salze. Es kann nun einerseits durch die Änderung des osmotischen Druckes, andererseits auf mechanischem Wege (durch die Eiskristalle) zu einer Schädigung der Bakterienzellen kommen. Bei extrem schnellem Einfrieren würde sich amorphes Eis bilden, da der Temperaturbereich, in welchem die Eiskristallbildung bevorzugt stattfinden würde, sehr schnell durchlaufen wird. Bei der

Bildung amorphen Eises finden keine Konzentrationsänderungen statt, und auch eine mechanische Schädigung der Zellen durch große Eiskristalle ist weitgehend ausgeschaltet. Demnach müßte die extrem schnelle Einfriermethode mit einem Temperaturabfall von + 20° C auf - 185° C in 1 - 2 sec die günstigsten Bedingungen bieten (Luyet, zitiert bei Neumann 1955). Dagegen haben Frasquelle und Barbier (1950) bei ihren Gefriertrocknungs-Versuchen mit einer mittelschnellen Einfriermethode, d.h. bei einem Temperaturabfall von etwa 20° C/min, gute Ergebnisse erzielt. Sie erklären, daß sich bei langsamem Temperaturabfall große Eiskristalle bilden, die die Strukturen der Zellen deformieren, wenn die Eisbildung genügend weit fortgeschritten und der Flüssigkeitsfilm zwischen den Kristallen äußerst weit eingeengt ist. Bei einer mittelschnellen Einfriermethode hingegen bildet das freie Wasser Mikrokristalle, wodurch die Zellstrukturen weitgehend geschont werden. Unter Anwendung des mittelschnellen Einfrierverfahrens trockneten sie Staphylokokken, Pneumokokken, Colibakterien, Proteusbakterien und Meningokokken sowie einige Viren. Lediglich die Trocknung der Meningokokken mißlang. Von den anderen Keimen wird nur berichtet, daß ihre Lebensfähigkeit und Eigenschaften erhalten blieben ohne Angabe des Verlustes vermehrungsfähiger Keime.

Heckly, Anderson und Rockenmacher (1958) beobachteten bei Gefriertrocknungs-Versuchen mit Pasteurella pestis, daß Zusatz von Glukose, Laktose oder Saccharose zum Suspensionsmedium bei der Methode des sog. "snap-freezing", bei der das Trockengut durch den Wasserdampfentzug gefriert, die Überlebensraten verbessert. Das Einfrieren des Trockengutes bei - 78° C vor Beginn des Gefriertrocknungsprozesses brachte hingegen auch mit Zusatz eines Zuckers schlechtere Ergebnisse als das snap-freezing. Die Autoren prüften außerdem den Effekt einer Abkühlung des Trockengutes auf - 5° C vor Beginn des Trocknungsprozesses und fanden, daß hier der Zusatz eines Zuckers zwar keine Verbesserung der Überlebensraten bewirkte, daß aber eine Kühlung der Keimsuspension vor dem Einfrieren eine ähnlich schützende Wirkung auf die Bakterien hatte wie sonst der Zusatz des Zuckers. Auch der pH-Wert der Keimsuspension scheint für die Überlebensrate nicht gleichgültig zu sein, da die Untersucher bei pH 7,6 beispielsweise bessere Ergebnisse erzielten als bei pH 7,0. Die Autoren geben dafür folgende Erklärung: Grundsätzlich wird der osmotische Druck von Proteinlösungen durch Änderungen der Temperatur und des pH-Wertes beeinflußt. Für die Erhaltung der Lebensfähigkeit der Bakterien scheint aber die Konstanz des osmotischen Gleichgewichtes von Bedeutung zu sein. Wird Glukose oder irgendein anderer Zucker zur Keimaufschwemmung zugegeben, so vermindert dies nach Ansicht der Untersucher ebenso das Ausmaß der osmotischen Druckänderung beim Einfrieren wie eine Kühlung auf - 5° C vor Beginn des Gefriertrocknungsprozesses. Bei extrem schnellem Ein-

frieren läuft der Vorgang so schnell ab, daß es zur Bildung von Mikrokristallen und nicht zu einer wesentlichen Änderung der Elektrolytkonzentration kommt. Bei extrem langsamem Einfrieren, wenn die Temperatur etwa um 1^{o}/min absinkt, sollen die Zellen angeblich genügend Zeit haben, sich der zunehmenden Elektrolytkonzentrierung anzupassen.

Die Erfahrung lehrte, daß die Keime den Einfrier- und Trocknungsprozeß besser überstehen, wenn sie nicht in Wasser, sondern in anderen Medien - sog. Schutzlösungen - suspendiert werden. Es wurden mehrere Theorien aufgestellt, wie man sich den Einfriervorgang und das Absterben der Keime in einer solchen Keimsuspension vorzustellen hat.

Luyet (referiert bei Neumann 1955) befürwortet das extrem schnelle Einfrieren. Der Zusatz hypertonischer Zuckerlösungen zur Schutzlösung soll eine gewisse Dehydrierung der Zellen bewirken, um damit die Verglasung (amorphe Eisbildung) des intrazellulären Wassers zu begünstigen. Denn die Bildung amorphen Eises ruft, wie bereits S. 6 erwähnt (Luyet, zitiert bei Neumann 1955), keine wesentlichen Störungen der Zellstruktur hervor.

Mazur, Rhian und Mahlandt (1957), die Pasteurella tularensis langsam und schnell in verschiedenen Medien einfroren, konnten feststellen, daß auch hypo- und isotonische Zuckerlösungen den Keimen Schutz bieten, wenn die Keimsuspension langsam eingefroren wird. Sie schlossen daraus, daß die Wirkung solcher Zuckerlösungen nicht in einer einfachen Dehydrierung bestehen könne, sondern daß die Zuckerlösungen in der Zelle ihre Wirkungen entfalten und eine intrazelluläre Eisbildung verhindern. Möglicherweise bietet eine Dehydrierung einen zusätzlichen Schutz für die Keime. - Die Annahme, daß die Zuckerlösung in die Zelle hineindiffundiert, ist falsch, da die Zucker durch spezifische Permeasen in einem energieverbrauchenden Prozeß von der Zelle aufgenommen werden (Cohn 1957).

Fry und Greaves (1951), die verschiedene Suspensionsmedien - Nährbouillon, Hämoglobin, Albumin, Glukose, Milch u.a. - auf ihre Schutzwirkung bei der Gefriertrocknung prüften, sehen die Wirksamkeit dieser Substanzen in einer geringfügigen Wasserretention, also einem Schutz vor extremer Austrocknung. Für den Einfrierprozeß hätten diese Stoffe demnach keine Bedeutung.

In einer sehr ausführlichen Arbeit befaßten sich Weiser und Osterud (1945) mit dem Einfrieren von Bakterien. Sie verwandten für ihre Versuche Escherichia coli. Die Keimaufschwemmungen wurden mit 1 %iger Peptonlö-

sung bereitet. Weiser und Osterud unterschieden zwei Faktoren, die das Absterben der Bakterien beim Einfrieren bewirken: Erstens der Einfriervorgang selbst, zweitens die Lagerung im eingefrorenen Zustand. Sie stellten an Hand ihrer Versuche weiter fest, daß es keine Eisbildung in der Bakterienzelle gibt, wie das von Haines (1937/38) behauptet wurde. - Den unmittelbaren Einfluß des Einfrierens auf das Absterben von Keimen in einer Suspension sehen die Autoren in der extrazellulären Eisbildung. Sie untersuchten die einzelnen Stadien der Eisbildung, indem sie in verschiedenen Abständen den Einfriervorgang unterbrachen und Keimzählungen machten. Das Ergebnis war, daß in den ersten Stufen zwischen 0 und 20 Sekunden nach Beginn - wenn die Eismasse noch glasig und unvollständig gefroren war - die Absterberate niedrig war. Zwischen 20 und 40 Sekunden stieg sie erheblich an, um zwischen 40 und 80 Sekunden wieder etwas geringer zu werden. Die höhere Absterberate zwischen 40 und 80 Sekunden war wohl schon durch das Verweilen der Bakterien im eingefrorenen Zustand bedingt. Sie soll durch die Bedingungen verursacht sein, die in dem interkristallischen Flüssigkeitsfilm herrschen, also durch die hohe Salzkonzentration. Für den erheblich höheren Keimverlust zwischen 20 und 40 Sekunden nach Einfrierbeginn wird die extrazelluläre Eisbildung verantwortlich gemacht, da irgendwelche indirekten Einflüsse - wie hohe Salzkonzentration - die Absterberate später noch auf gleicher Höhe halten würden. Die Untersucher behaupten, daß die Höhe der Einfriertemperatur für die Absterberate keine Rolle spiele, d.h. der unmittelbar bakterienschädigende Einfluß hängt nicht von der Einfriertemperatur ab. Die Unterschiede in den Absterberaten waren nach ihrer Meinung nur durch die Lagerung der Bakterien im eingefrorenen Zustand bedingt. Dieser sog. "Lagerungstod" stellt eine direkte Funktion von Zeit und Temperatur dar. Das Absterben während der Lagerung bei Temperaturen über - 30° C geht schneller vor sich als bei - 30° C und darunter. Bei - 30° C soll der eutektische Punkt dieser Keimaufschwemmung erreicht sein; daher fällt bei tieferer Temperatur eine Schädigung durch hohe Salzkonzentration in dem Flüssigkeitsfilm zwischen den Eiskristallen fort. Von den Untersuchern wurde auch der Einfluß von Temperaturschwankungen auf eine gefrorene Bakteriensuspension geprüft: sie erwiesen sich als völlig bedeutungslos. Diese Tatsache spricht gegen die Theorie der intrazellulären Eisbildung, da bei wiederholten Temperaturschwankungen der Temperaturbereich, in dem die intrazelluläre Eisbildung stattfindet, mehrmals durchlaufen würde. Für die Bakterienzellen müßte das eine entsprechend größere Schädigung zur Folge haben. Wiederholte Temperaturschwankungen hätten daher nach Ansicht der Autoren einen signifikant größeren Keimverlust hervorrufen müssen als einfaches Einfrieren.

Die Annahme, daß für den hier gegebenen Fall der eutektische Punkt des Suspensionsmittels bei - 30° C liegt, wurde erklären, warum die Einfriergeschwindigkeit je nach der verwendeten Schutzlösung variiert werden muß.

Über die Einwirkung von wiederholten Einfrierungen auf Escherichia coli wird in einer Arbeit von Weiser und Lief (1940) sowie von Harrison jr. (1955) berichtet. Bei mehrmaligem Einfrieren und Auftauen schien die zweite Einfrierung den größten Keimverlust zu verursachen. Freilich hat das für den Gefriertrocknungsprozeß keine weitere Bedeutung. - Von größerem Interesse dagegen ist das Alter der verwendeten Kultur bzw. der Stoffwechselzustand der Bakterienzellen.

Hegarty und Weeks (1940) prüften die Widerstandsfähigkeit von Colibakterien gegen Kälte während der logarithmischen Wachstumsphase. Aus einer Bouillonkultur von Escherichia coli, die bei 37° C bebrütet wurde, entnahmen sie während acht Stunden in zehnminutigem Abstand jeweils eine Probe zur Keimzählung und eine zur Bestimmung der Zahl kälteresistenter Zellen bei 0° C für 5 Minuten. Es zeigte sich, daß anfangs nur 8 % der Zellen gegen die Abkühlung empfindlich waren. Während der Latenzphase, die 40 Minuten dauerte, beobachteten sie in den ersten 20 Minuten keinen Anstieg der Anzahl kälteempfindlicher Keime. Während der folgenden 20 Minuten wurden weitere 12 % der Zellen gegen Abkühlung empfindlich. Mit Beginn der logarithmischen Phase wuchs die Zahl der empfindlichen Zellen rasch, an manchen Punkten der Wachstumskurve wurden sogar 99 % der Zellen zerstört. Am Umkehrpunkt, d.h. zu Beginn der stationären Phase nach etwa sechs Stunden, verringerte sich rasch die Zahl kälteempfindlicher Zellen bis auf weniger als 25 % nach etwa siebeneinhalb Stunden. - Die bei 0° C gehaltenen Proben zeigten später noch einen weiteren Abfall der Keimzahl. Die Empfindlichkeitsmaxima stimmten gut überein mit den Teilungswellen der logarithmischen Wachstumskurve. Daraus schlossen die Autoren, daß sie mit bestimmten Stufen des Teilungsprozesses zusammenhängen müßten. - Obwohl es sich bei diesen Versuchen nur um Abkühlung der Keime bei 0° C handelte, ist für den Einfrierprozeß sicher ein ähnliches Verhalten zu erwarten.

Der zweite einschneidende Vorgang bei der Gefriertrocknung ist der Wasserentzug aus dem eingefrorenen Trockengut. Durch den Wasserentzug aus dem Material in gefrorenem Zustand kommt es nicht zu einer Konzentrationserhöhung der gelösten Salze wie bei einer Destillation. Da der Wasserentzug bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes erfolgt, werden die Zellproteine nach Neumann (1955) nicht denaturiert. Obwohl die Lyophilisation die schonendste Methode der Trocknung darstellt, kann auch sie einen großen Keim-

verlust nicht verhindern, wie aus den Angaben von Glover (1946) zu ersehen ist. Die bei - 76° C gelagerten eingefrorenen Suspensionen von Mycobacterium tuberculosis zeigten nach 180 Tagen keinen bedeutenden Verlust, während nach Lyophilisierung die Zahl infektionstüchtiger Keime - getestet an Hamster und Meerschweinchen - nur noch den hundertsten bis tausendsten Teil des Ausgangswertes betrug.

Systematische Untersuchungen mit dem Ziel, eine optimale Überlebensrate zu finden, wurden von Hörter (1957) gemacht. Es wurden 32 Stämme getestet. Die Untersuchungen hatten zum Ziel, das Verhalten bzw. die Überlebensrate einer Reihe von Bakterien bei der Gefriertrocknung zu bestimmen. Es wurden zwei verschiedene Einfriertemperaturen gewählt, während im übrigen nur eine einzige Schutzlösung und nur ein Zusatz verwendet und Trockentemperatur sowie Trockenzeit stets gleich gehalten wurden. Als Schutzlösung verwendete Hörter durch Zentrifugieren entrahmte Kuhmilch mit einem Glukosezusatz von 7,5 % und einem pH-Wert von 6,2-6,3. Die Suspension wurde durch Abschwemmen der Schrägagarkulturen gewonnen und vor der Trocknung eine Stunde bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt. Der Trocknung ging außerdem eine Keimzählung nach Demeter voraus. Hörter wählte zwei verschiedene Einfriertemperaturen: a) - 70° C, b) - 20° C. Damit wollte er sowohl eine schnelle als auch eine langsame Einfriermethode prüfen. Das Trockengut wurde danach bei - 35° C gehalten. Im Verlauf der Trocknung ließ er aber die Temperatur bis zu Zimmertemperatur ansteigen. Hörter fand bei langsamem Einfrieren keinen großen Unterschied in den Überlebensraten der Keime nach der Trocknung - mit Ausnahme der Salmonellen.

Vergleicht man diesbezüglich die Überlebensraten der langsam und schnell eingefrorenen Keime miteinander, so lassen sich beträchtliche Differenzen feststellen - beispielsweise bei Pasteurella pseudotuberculosis 73,16 : 27,67 %. Die meisten Keime überstehen die Trocknung nach langsamem Einfrieren besser; zu diesen gehören die Gattungen Aerobacter und Escherichia, ferner Listeria monocytogenes, Corynebacterium pyogenes, Brucella abortus, die Gruppe der Streptokokken u.a. Die Unterschiede zwischen beiden Verfahren liegen zwischen 15 und 35 %. Bei den Salmonellen und den Pasteurellen waren keine auffallenden Differenzen zwischen beiden Methoden zu finden.

Aus seinen Ergebnissen zieht Hörter den Schluß, daß es keine generelle Einfriermethode bei der Gefriertrocknung gibt, sondern daß sie auf die Keimart abgestimmt sein muß. Auch die Art der Schutzlösung muß der Keimart angepaßt

sein, wie das in der Verwendung der Mixtura desiccans[1)] anstelle von entrahmter Kuhmilch bei der Trocknung von Brucella abortus deutlich wird. Unter Anwendung der schnellen Einfriermethode stieg die Überlebensrate der Brucellen von 32,47 % bei Magermilch auf 74,19 % bei Mixtura desiccans. Bei der langsamen Methode lauten die entsprechenden Werte 49,74 % für Magermilch bzw. 57,77 % für Mixtura desiccans. Auch hier bestätigt sich die Beobachtung anderer Autoren, daß man mit den Einfriermethoden auch die Art der Schutzlösung variieren muß.

Mit Ausnahme der Mikrokokken brauchten die getrockneten Keime kaum längere Zeit zum Angehen der Kulturen. Die Mikrokokken benötigten 72 Stunden, um genügend große Kolonien zu bilden. An Hand zahlreicher Stämme von Escherichia coli wurde von Hörter nachgeprüft, wie sich einzelne Typen einer Art gegenüber der Gefriertrocknung verhalten. Er fand Abweichungen von maximal 22 % bei den Überlebensraten, was nach seinen Erfahrungen vielleicht schon nicht mehr in die normale Schwankungsbreite bei der Hochvakuumgefriertrocknung fällt.

Die Trocknungszeit betrug bei Hörter 23 Stunden, was recht lang erscheint. Der Druckabfall erfolgte so langsam, daß erst nach etwa 20 Stunden Werte unter 10^{-1} Torr erreicht wurden. Vielleicht könnte dies auf eine mangelhafte Leistungsfähigkeit der Vorpumpe bei der Gefriertrocknungsanlage G 01 von Leybold zurückgeführt werden. Im Trockengut war erst nach 20 Stunden makroskopisch kein Eis mehr zu finden. Diese Angabe ist nicht recht erklärlich, zumal eine Ampulle nicht mehr als 0,3 ml Substanz enthielt. - Die so gewonnenen Überlebensraten geben aber einen guten zahlenmäßigen Überblick über das Verhalten einzelner Stämme einer Keimspezies gegenüber der Gefriertrocknung unter gleichen Bedingungen.

Obwohl heute die Gefriertrocknung weite Verbreitung gefunden hat und als schonende Konservierungsmethode angesehen wird, finden sich in einer Arbeit von Feldmann (1959) vergleichende Untersuchungen über Trocknung und Gefriertrocknung, die eher für eine einfache Trocknung aus flüssigem Zustand sprechen. Es wurden Enterobakterien, Corynebakterien, Kokken, Haemophilus und Farbstoffbildner - insgesamt 100 Stämme - untersucht. Dabei wurden nach einfacher Trocknung bessere Überlebensraten erzielt als nach Gefriertrocknung. Auch für die Lagerung erscheint nach den Angaben die Trocknung aus flüssigem Zustand vorteilhafter. Dies wird auf die festere gelatinöse

---

1) Zusammensetzung der Mixtura desiccans: 1 Teil Nährlösung und 3 Teile Serum unter Zusatz von 7,5 % Glukose.

Konsistenz des Trockengutes zurückgeführt, in welchem die Keime nicht so sehr den schädigenden Faktoren - Spuren von O_2, Temperatur und Licht - ausgesetzt sind, wie in dem porösen Material nach der Lyophilisierung. Beide Trocknungsverfahren hatten keinen Einfluß auf die biologischen Eigenschaften der Überlebenden aus den untersuchten Stämmen.

Über die Wiederdurchfeuchtung des Trockengutes finden sich in der Literatur keine besonderen Angaben; den Autoren scheint meist die Verwendung von sterilem Aqua destillata zu genügen. - Wassermann und Hopkins (1957) konnten aber an Serratia marcescens zeigen, daß das Medium, welches dem getrockneten Material zugefügt wird, nicht gleichgültig ist. Sie restituierten ihr Trockengut mit Aqua destillata, Malatlösung, physiologischer Kochsalzlösung, Glukoselösung u.a. und fanden optimale Werte bei der Verwendung von Malatlösung. Auch bei anschließender dreistündiger Bebrütung bei 37° C zeigte sich die günstigste Wirkung bei dem mit Malatlösung restituierten Präparat. Die Autoren führen dies auf eine Permeabilitätsänderung der Zellwand zurück. Bei einer Restitution mit Wasser würde das osmotische Gleichgewicht der Zellen gestört, was eine schwere Schädigung bzw. das Absterben der Bakterienzellen zur Folge hat.

III PROBLEMSTELLUNG

Insbesondere die neueren Arbeiten hatten vorwiegend das Ziel, eine Methode des Lyophilisierens auszuarbeiten, die optimale Überlebensraten gewährleistet. - In dieser Arbeit soll unter Verwendung von nur einer Schutzlösung an dem Stamm Escherichia coli 530 die Abhängigkeit der Überlebensraten von

a) Einfriergeschwindigkeit
b) Stoffwechselzustand der Kultur
c) Trocknungsgeschwindigkeit

geprüft werden.

IV EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. MATERIAL

1. Alle Untersuchungen wurden mit Escherichia coli 530 durchgeführt. Die Verwendung von Staphylokokken erwies sich als unvorteilhaft. Wie sich bei den ersten Versuchen herausstellte, wirkt sich ihre Eigenschaft, auch in einer Suspension noch teilweise in haufenartiger Ansammlung zu verbleiben, bei der Anfertigung der Verdünnungsreihen störend aus.
2. Die Stammkulturen wurden auf Hammelblutagar[1] gehalten, ebenso wurden die Kulturen für die jeweiligen Versuche auf Hammelblutagar gezüchtet.
3. Die Herstellung der Keimsuspensionen erfolgte mit steriler Nährbouillon[2] von pH 7,0.
4. Die Verdünnungsreihen der Keimsuspensionen für die Keimzählungen im Plattenverfahren wurden mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gemacht.
5. Für die Keimzählungen im Plattenverfahren wurde Nähragar[3] verwandt.
6. Bei der Untersuchung der Einfriervorgänge erfolgte das Einfrieren der Suspension in Aluminiumröhrchen von ca. 8,5 cm Länge, 1,6 cm Durchmesser und einem horizontalen, ebenen Boden, die mit Zellstoffstopfen und Aluminiumkappe verschlossen und sterilisiert worden waren.
7. Die Kühlmischungen wurden mit Trockeneis und Azeton bzw. Trichloraethylen hergestellt. Letzteres mußte anstelle von Azeton verwendet werden, um Kunststoffisolationen, die mit der Kühlmischung in Berührung kamen, nicht zu beschädigen.
8. Bei den Untersuchungen des Trocknungsprozesses wurde Einfrieren und Trocknen der Suspension in Ampullen vorgenommen, die aus sterilen Reagenzgläsern mit der Abmessung 140 mal 12 mm angefertigt worden waren.
9. Die genaue Abmessung von 0,1 ml der zu trocknenden Keimsuspension wurde mit einer 0,1 ccm-Pipette vorgenommen.

---

1) Zusammensetzung des Hammelblutagars: 1000 ml Fleischwasser, 10 g Pepton, 5 g Kochsalz, Zusatz von Sodalösung zur pH-Einstellung, 25 g geschnittener Agar; auf 100 ml dieses Nähragars werden 5 ml defibriniertes Hammelblut zugesetzt.

2) Zusammensetzung der Nährbouillon: 1000 ml Fleischwasser, 10 g Pepton, 5 g Kochsalz, Zusatz von Sodalösung zur pH-Einstellung auf pH 7,0.

3) Der Nähragar entspricht in seiner Zusammensetzung der Nährbouillon mit Zusatz von 25 g geschnittenem Agar.

10. Die Gefriertrocknungsversuche wurden mit der Anlage G 01 der Firma Leybold, Köln, durchgeführt. Es mußte allerdings zunächst die Verlegung einer Vakuummeßstelle vorgenommen werden, um Druckmessungen zwischen Kühlfalle und Trockengut zu ermöglichen, die sonst nur zwischen Pumpe und Kühlfalle vorgenommen werden konnten.
11. Die Temperaturmessungen und deren dauernde automatische Registrierung erfolgte mit einem Thermoelement mit 6-Punktschreiber, dem "Elnik-Kompensatorschreiber Typ NSBB Y" der Firma Heraeus, Hanau. Dieses konnte auch für Temperaturen von - 84° C bis über + 30° C verwendbar gemacht werden, wenn die Bezugstemperatur bei - 84° C gewählt wurde, die in einer Kühlmischung im verschlossenen Dewargefäß über lange Zeit aufrechterhalten werden konnte. Die Meßstellen des Thermoelementes wurden über ein Kreuzstück aus Glas mit geschliffenen Hülsen an den seitlichen Teilen in das System geleitet.
12. Die Restitution des getrockneten Materials erfolgte mit sterilem Aqua destillata.

B. METHODEN

Zunächst wurde das Verhalten der Keime beim Einfriervorgang untersucht, und zwar bei 10 verschiedenen Temperaturstufen im Bereich von - 10° bis - 80° C. Dabei wurden eine ruhende, eine wachsende und eine synchronisiert wachsende Kultur dem Prozeß unterworfen.

1. Das Einfrieren der ruhenden Kultur

Von einer 24-stündigen Kultur von Escherichia coli 530 auf Hammelblutagar wurden zwei gut gewachsene Kolonien mit der Öse in ca. 4 ml Nährbouillon von 0° C übertragen, sodaß man annähernd eine Dichte von 10^7 Keimen in einem ml der Suspension annehmen konnte. Von der Aufschwemmung wurde 1 ml zur Keimzählung entnommen. Eine Verdünnungsreihe wurde angefertigt und von verschiedenen Verdünnungsstufen Keimzählplatten gegossen. Nun wurden jeweils 0,05 ml der Suspension bei - 10°, - 20°, - 25°, - 30°, - 35°, - 40°, - 50°, - 60°, - 70° und - 80° C eingefroren. Die Kühlmischung wurde durch die entsprechende Zugabe von Trockeneis auf die gewünschte Temperatur gebracht. Die Aluminiumröhrchen wurden darin vorgekühlt, sodaß sie beim Einbringen des Materials bereits die entsprechende Temperatur hatten. Die Röhrchen mit dem eingefrorenen Material wurden bis zum Ende des Experimentes in einer Kühlmischung von - 79° C aufbewahrt.

Durch sorgfältiges Verschließen der Röhrchen mit Zellstoffstopfen und Aluminiumkappe konnte der Zutritt von CO_2 oder Azetondampf vermieden werden. Wenn von jeder Temperaturstufe eingefrorenes Material vorhanden war, begann das Auftauen durch Zugabe von 1 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung von Zimmertemperatur. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe je Röhrchen angefertigt, und aus mehreren Verdünnungsstufen einer Reihe wurden Keimzählplatten gegossen. Die Zählung der auf den Platten gewachsenen Kolonien erfolgte nach 24-stündiger Bebrütung bei 37^{o} C. Versuchsweise wurden die Platten daran anschließend weitere 12 Stunden bebrütet; dabei konnte keine wesentliche Veränderung gegenüber der Auszählung nach 24 Stunden beobachtet werden.

2. Das Einfrieren einer wachsenden Kultur

In der oben beschriebenen Art und Weise erfolgte auch hier die Herstellung der Keimaufschwemmung; es wurde lediglich etwa doppelt so viel Keimmaterial und eine größere Menge Bouillon - 10 ml - verwendet. Die Bouillonkultur, die sich in einem geschlossenen Erlenmeyerkolben befand, wurde bei 37^{o} C bebrütet, und in Abständen von zwei Stunden wurden dreimal Keimzählungen vorgenommen, um Werte für die Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur zu erhalten. Zwischen der zweiten und dritten Keimzählung wurden sodann Portionen von 0,05 ml aus der Kultur entnommen und bei den verschiedenen Temperaturstufen (- 10^{o}, - 20^{o}, - 25^{o}, - 30^{o}, - 35^{o}, - 40^{o}, - 50^{o}, - 60^{o}, - 70^{o}, - 80^{o} C) eingefroren. Die zeitlichen Abstände der Probenentnahmen wurden vermerkt; sie betrugen meist zehn Minuten. Das Einfrieren der Proben erfolgte wieder in Aluminiumröhrchen, die schon auf die betreffende Temperatur vorgekühlt waren. - Die eingefrorenen Portionen wurden ebenfalls bis zum Schluß des Experimentes in einer Kühlmischung von - 79^{o} C aufbewahrt. Dann erfolgte das Auftauen der Proben mit steriler physiologischer Kochsalzlösung von Zimmertemperatur und die Keimzählung in der bereits beschriebenen Art und Weise.

Die Bebrütung der Kultur im Wasserbad anstatt im Brutschrank hatte nur technische Gründe: so konnte die Übertragung der Proben aus der Kultur über einen kürzeren Weg erfolgen.

3. Das Einfrieren der synchronisiert wachsenden Kultur

Von einer 12-stündigen Kultur von Escherichia coli 530 auf einer Blutagarplatte wurde eine kleine Kolonie mit der Öse entnommen, in 1 ml Nährbouillon

aufgeschwemmt und davon mit weiterer Nährbouillon eine Verdünnung von $1:10^3$ hergestellt. Etwa 40 ml dieser Suspension wurden in einen sterilen Erlenmeyerkolben verbracht und der Kältesynchronisation unterworfen (Jacherts 1958). Aus der synchronisierten Kultur wurden alle 5 Minuten zwei Proben entnommen: eine von 0,5 ml zur Keimzählung sowie eine von 0,05 ml, welche in Aluminiumröhrchen bei - 25° C eingefroren wurde. Nach Entnahme der beiden Proben wurde von der ersteren sofort eine Verdünnungsreihe und Keimzählplatten angefertigt. Die eingefrorenen Proben wurden inzwischen in der Kühlmischung wie oben beschrieben aufbewahrt und schließlich bei Zimmertemperatur aufgetaut. Es folgte bei jeder Probe eine Keimzählung.

4. Das Auftauen

Um einen Anhaltspunkt für die Keimverluste beim Auftauen des gefrorenen Materials zu gewinnen, wurde untersucht, ob sich Unterschiede in den Überlebensraten ergeben, wenn der Auftauvorgang bei verschiedenen Temperaturen abläuft. Es wurde eine Keimaufschwemmung mit gekühlter Nährbouillon (0° C) angefertigt und davon 6 Proben bei - 25° C eingefroren. Das Auftauen erfolgte dann bei 0°, + 10°, + 20°, + 30°, + 40° und + 50° C, dem sich sofort eine Keimzählung in jeder Probe anschloß.

5. Der Trocknungsprozeß

Die nachfolgend beschriebenen Versuche sollten dazu dienen, die Wirkung von verschiedenen Temperaturen in der unmittelbaren Umgebung des Trockengutes - z.B. in der Kühlmischung - während des Gefriertrocknungsprozesses auf das Verhalten der Keime bzw. auf deren Überlebensrate zu prüfen. Da sich in den vorangegangenen Versuchen eine Einfriertemperatur von - 25° C als besonders günstig erwiesen hatte, wurde das Trockengut bei dieser Temperatur eingefroren. Die Temperaturmessungen wurden mit einem Thermoelement vorgenommen und während des ganzen Versuches automatisch registriert. An drei Stellen des Systems erfolgte eine Temperaturmessung: in der Kühlfalle, in der das Trockengut umgebenden Kühlmischung und vor allem im Trockengut selbst. Das Problem, die Lötstellen des Thermoelementes vakuumdicht in das System zu führen, wurde gelöst, indem die Ampulle über ein Kreuzstück mit dem Recipienten verbunden wurde. Über das Kreuzstück wurden die Drahtzuführungen in das System geleitet. Die seitlichen Teile des Kreuzstückes waren mit geschliffenen Hülsen und entsprechenden Glasstopfen versehen; den letzteren waren je zwei Vakuon-12-Drähte vakuumdicht eingeschmolzen, die in die Leitung zwischen Instrument und Lötstelle eingeschaltet wurden. Die dadurch entstandenen neuen

Lötstellen verursachten geringe Veränderungen bei der Registrierung der Temperaturwerte, sodaß die Eichskala durch eine neue Eichung korrigiert werden mußte. Da eine Lötstelle in das Trockengut eingefroren werden sollte, konnte die Suspension nicht in eine bereits vorgekühlte Ampulle gebracht werden, sondern die Ampulle mußte nach Füllung mit der Keimsuspension zuerst an das System angeschlossen werden. Befand sich die Lötstelle sicher in der Flüssigkeit, konnte das Einfrieren des Trockengutes vor sich gehen.

Die Druckmessung wurde mittels eines thermoelektrischen Vakuummeters vorgenommen, welches zwischen Kühlfalle und Ampulle im Seitenschluß angebracht war. Die Druckwerte wurden am Anfang jedes Versuches in Abständen von 0,5 Minuten, später noch alle 5 und schließlich noch alle 15 Minuten abgelesen und notiert. Mit der Vorpumpe wurde bereits ein Vakuum von $2,9 \times 10^{-2}$ Torr erreicht, welches als ausreichend betrachtet wurde, sodaß auf die Anwendung der Diffusionspumpe verzichtet werden konnte. Nach Einschalten der Vorpumpe fiel der Druck ziemlich schnell auf $4,0 \times 10^{-2}$ Torr ab und dann etwas langsamer bis auf $2,9 \times 10^{-2}$ Torr. Nach ca. eineinhalb Stunden wurde kein weiterer Druckabfall registriert. Dennoch wurde die Trocknung von diesem Punkt ab etwa zwei Stunden fortgesetzt, wobei aber keine Temperatur- und Druckänderungen mehr erfolgten. Nach Abschluß der Trocknung - also nach durchschnittlich vier Stunden - wurde das System belüftet und die Ampulle abgenommen. Die getrocknete Substanz wurde mit 0,1 ml sterilem Aqua destillata von Zimmertemperatur aufgelöst und davon eine Verdünnungsreihe gemacht. Mit einem Teil der physiologischen Kochsalzlösung für die erste Verdünnungsstufe wurde gleichzeitig die Lötstelle nochmals abgespült, um eventuell haftende Reste des Trockengutes mitzuerfassen. Von mehreren Stufen der Verdünnungsreihe wurden wieder Keimzählplatten gemacht, die bei 37^{o} C 24 Stunden bebrütet wurden. Um auch zu prüfen, ob einzelne Keime erst nach längerer Zeit gut sichtbare Kolonien bilden, wurden die Zählplatten nach der ersten Keimzählung (nach 24 Stunden) für weitere 12 Stunden bebrütet und eine weitere Zählung vorgenommen. Dabei ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede. In einer Probe des ungetrockneten Materials wurde gleich nach Beginn des Trocknungsprozesses eine Keimzählung gemacht, die als Ausgangswert für den betreffenden Versuch diente. Die Lötstelle wurde jeweils nach dem Gebrauch und vor der neuen Benutzung mit Sagrotanlösung desinfiziert und mit sterilem Aqua destillata gut abgespült. Der Gummischlauch als Verbindung zwischen Ampulle und Kreuzstück wurde nach zwei Versuchen erneuert.

C. ERGEBNISSE

1. Das Einfrieren einer ruhenden Kultur

Die Zahl überlebender Keime aus einer ruhenden Kultur bei den verschiedenen Einfriertemperaturen ist in Abb. 1 dargestellt. Die Schädigung durch den Einfrierprozeß ist für Escherichia coli 530 offenbar am geringsten, wenn man eine Einfriertemperatur entweder um - 25° C oder um - 80° C wählt. In dem Temperaturbereich zwischen - 35° C und - 60° C wirkt sich der Einfrierprozeß deutlich ungünstiger auf die Keime aus; man muß mit Verlusten von ca. 90 % rechnen. Die maximale Überlebensrate liegt bei 30 v.H.

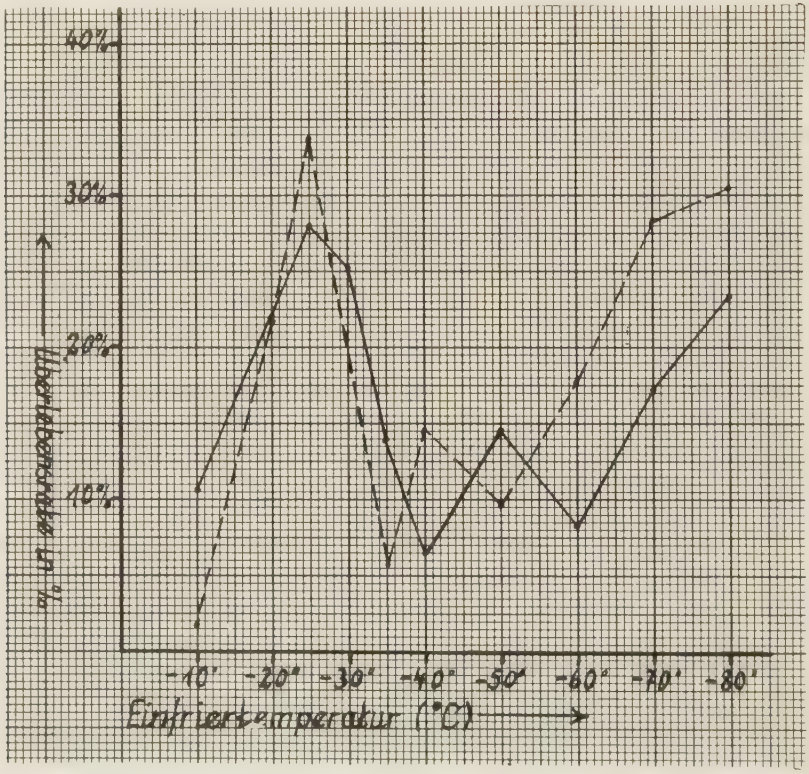

Abb. 1
Überlebensraten in Prozent nach Einfrieren von Escherichia coli 530 aus einer ruhenden Kultur bei verschiedenen Temperaturen und Auftauen bei + 22° C.

2. Das Einfrieren einer wachsenden Kultur

Eine wesentlich größere Empfindlichkeit zeigen die Keime bei Kälteeinwirkung während der Phase intensiver Stoffwechseltätigkeit. In einer wachsenden Kultur befinden sich Keime in verschiedenen Stoffwechselphasen nebeneinander. Es ist nur ein relativ kleiner Prozentsatz von Keimen zur Zeit der Kälteeinwirkung in Stoffwechselruhe. Da offenbar nur solche Keime den Einfrierprozeß überstehen, kann man also beim Einfrieren einer wachsenden Kultur nur mit niedrigen Überlebensraten rechnen, die - wie aus Abb. 2 ersichtlich - unter 5 % liegen.

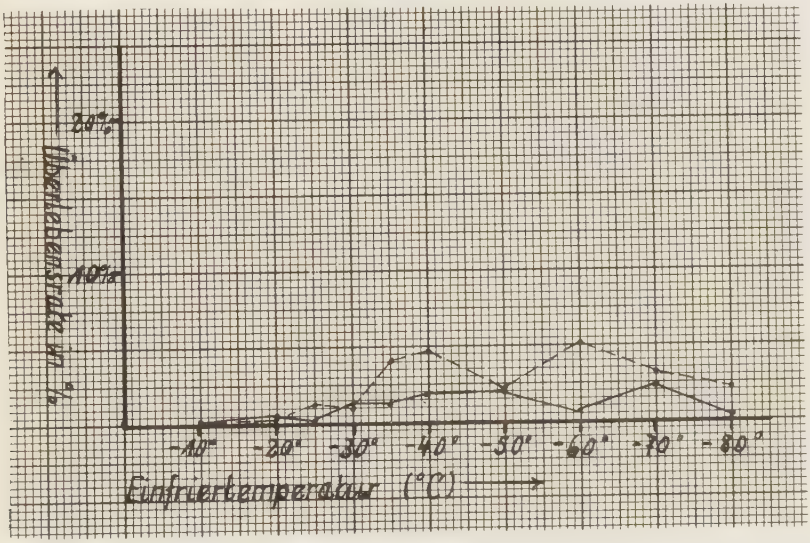

Abb. 2
Überlebensraten in Prozent nach Einfrieren von Escherichia coli 530 aus einer wachsenden Kultur bei verschiedenen Temperaturen. Auftauen bei + 22° C.

3. Das Einfrieren einer synchronisiert wachsenden Kultur

Um die unterschiedliche Abtötung durch den Einfrierprozeß in verschiedenen Wachstumsphasen noch deutlicher zu machen, wurden verschiedene Kulturen synchronisiert, d.h. die Keime einer Kultur auf gleiche Stoffwechselphase gebracht. Die Überlebensraten nach Einfrieren einer synchronisiert wachsenden Kultur zeigen die Abhängigkeit der Kälteempfindlichkeit der Keime von ihrer

Stoffwechselintensität (Abb. 3). Werden die Keime in dem Augenblick von der Kälteeinwirkung getroffen, in dem sie sich zur Teilung anschicken, ihr Stoffwechsel sich also in einer Ruhephase befindet, so wird die Kälteschädigung verhältnismäßig gut vertragen. In den Proben, die während der Wachstumsphase entnommen und eingefroren wurden, waren nach dem Auftauen dagegen praktisch keine lebenden Keime mehr vorhanden.

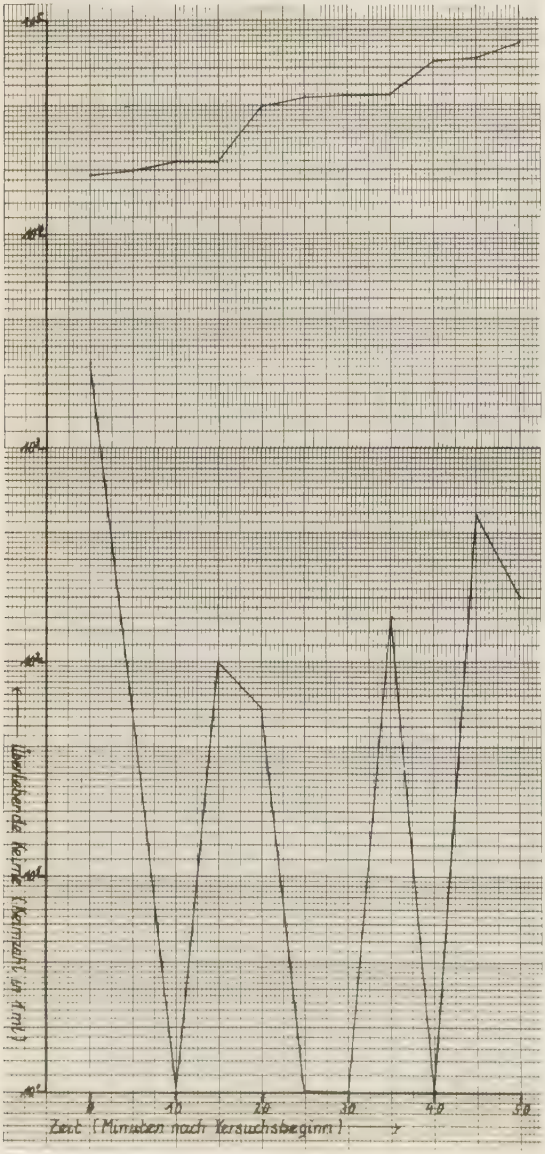

Abb. 3
Überlebende Escherichia coli 530 aus einer synchronisiert wachsenden Kultur nach Einfrieren bei - 25° C und anschließendem Auftauen bei + 22° C.

4. Das Auftauen bei verschiedenen Temperaturen

Der Auftauprozeß wurde an Keimen aus einer ruhenden Kultur untersucht, die bei - 25° C eingefroren worden waren. Der Keimverlust beim Einfrierprozeß ist sicher nicht allein durch diesen bedingt, sondern umfaßt auch die Anzahl von Keimen, die beim Auftauen abstirbt. Welche Rolle die Temperatur des zum Auftauen verwendeten Mediums spielt - in diesem Falle ist es physiologische Kochsalzlösung - zeigt die Abb. 4. Die optimale Auftautemperatur liegt hier bei etwa + 30° C.

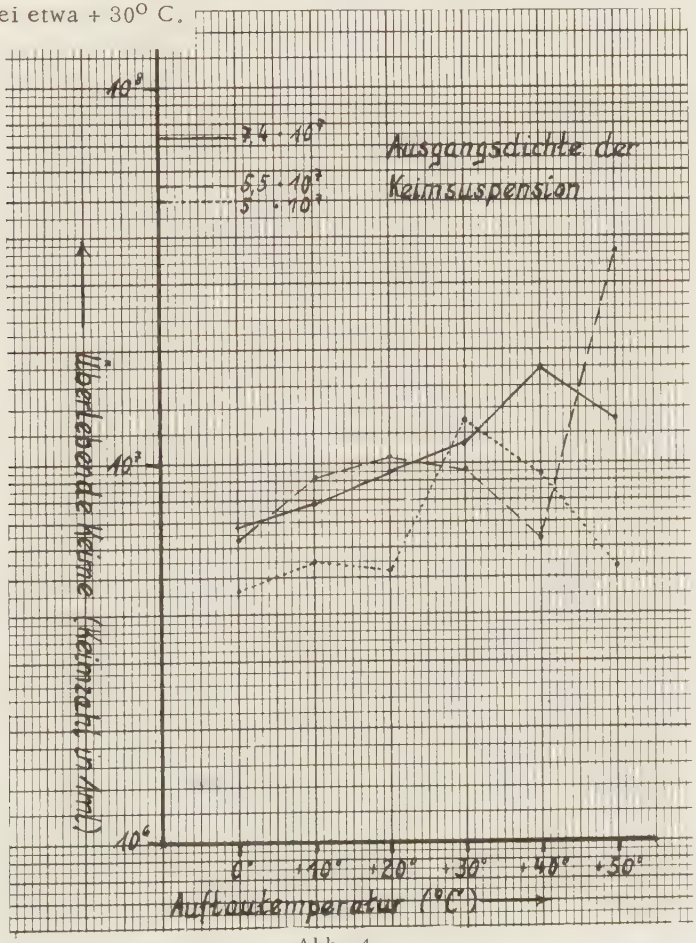

Abb. 4

Überleben von Escherichia coli 530 nach Auftauen bei verschiedenen Temperaturen, Einfriertemperatur - 25° C.

Möglicherweise entsprechen jedoch die hier wiedergegebenen Werte nicht ganz der Wirklichkeit, weil die zugeführte Wärmemenge infolge Teilabsorption durch die Aluminiumröhrchen, in denen sich das eingefrorene Material befand, nicht mehr groß genug war. Die effektiven Optimalwerte liegen also wahrscheinlich etwas unter + 30° C. Das Auftauen bei den Untersuchungen über den Einfrierprozeß geschah stets bei 22° C; es kann demnach angenommen werden, daß es nahezu unter den günstigsten Bedingungen erfolgte.

5. Die Gefriertrocknung

a) Temperaturverlauf

Der Temperaturabfall im Trockengut war nicht von außen steuerbar, da eine nicht genau meßbare Kältemenge von der Ampulle aufgenommen wurde. Zudem hatte die Ampulle noch eine schlechte Wärmeleitfähigkeit. Durch Vorversuche wurde nun festgestellt, daß bei einer bestimmten Menge der Kühlmischung deren Temperatur - 28° C betragen mußte, um in dem Trockengut von 0,1 ml in der Ampulle eine Temperatur von - 25° C zu erzielen, die dann ca. eine Minute beibehalten werden konnte. Wenn das Trockengut völlig gefroren war - was bei der geringen Menge nur wenige Sekunden dauerte - und das Thermoelement etwa eine Minute - 25° C registriert hatte, wurde die Gefriertrocknungsanlage eingeschaltet und das Trockengut in eine andere Kühlmischung gebracht. In dieser wurde die gewählte Trocknungstemperatur während des ganzen Prozesses aufrechterhalten.

Nachdem im Höchstfalle nur etwa 30 % der Keime den Einfriervorgang überlebten, möchte man annehmen, daß der eingreifende Vorgang des Wasserentzuges die Überlebensrate nochmals um ein beträchtliches Maß verringert. Die Untersuchungen ergaben jedoch im ungünstigsten Falle immerhin noch eine Ausbeute von 13 %. Inwieweit die Überlebensraten von der Trocknungstemperatur, d.h. der Temperatur in der das Trockengut umgebenden Kühlmischung, abhängig sind, soll Abb. 5 veranschaulichen. Bei der Kühlung des Trockengutes von außen, bei der die Temperatur der Kühlmischung stets konstant gehalten wird, spielen sich durch den Wasserentzug im Trockengut interessante Temperaturveränderungen ab (Abb. 6). Dabei werden je nach der Kühltemperatur verschiedene Höchstwerte der Verdunstungskälte erreicht (Abb. 7). Abb. 6 zeigt den Temperaturverlauf im Trockengut bei den verschiedenen Trocknungstemperaturen. Die Temperaturen wie sie aus Abb. 6 ersichtlich sind, stellen nicht die tatsächlichen Werte der Verdunstungskälte dar; infolge des Temperaturgefälles von der Kühlmischung zum Trockengut findet während des Verdunstungsvorganges dauernd ein Temperaturausgleich mit der Umgebung statt.

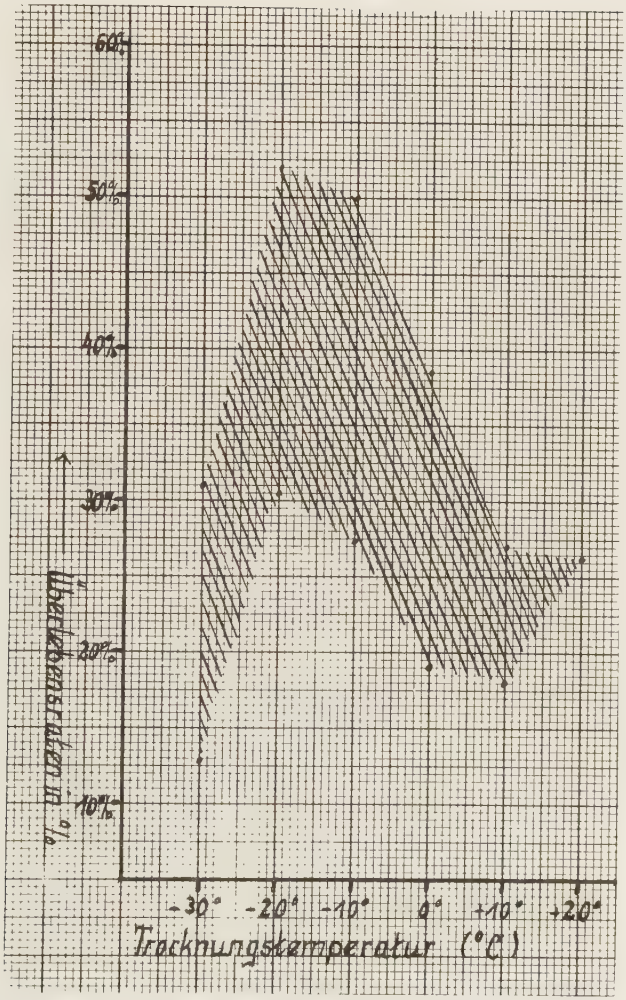

Abb. 5
Abhängigkeit der Überlebensraten
von der Trocknungstemperatur
(Darstellung der Streuungsbreite)

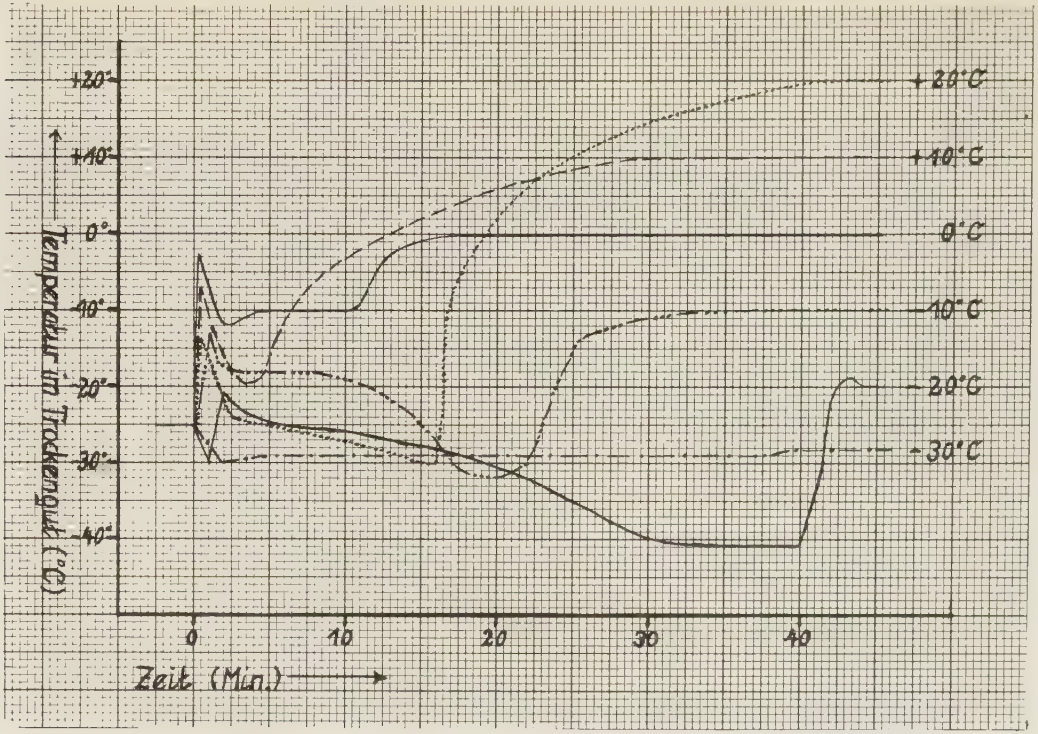

Abb. 6
Temperaturverlauf im Trockengut
bei Anwendung verschiedener Trocknungstemperaturen

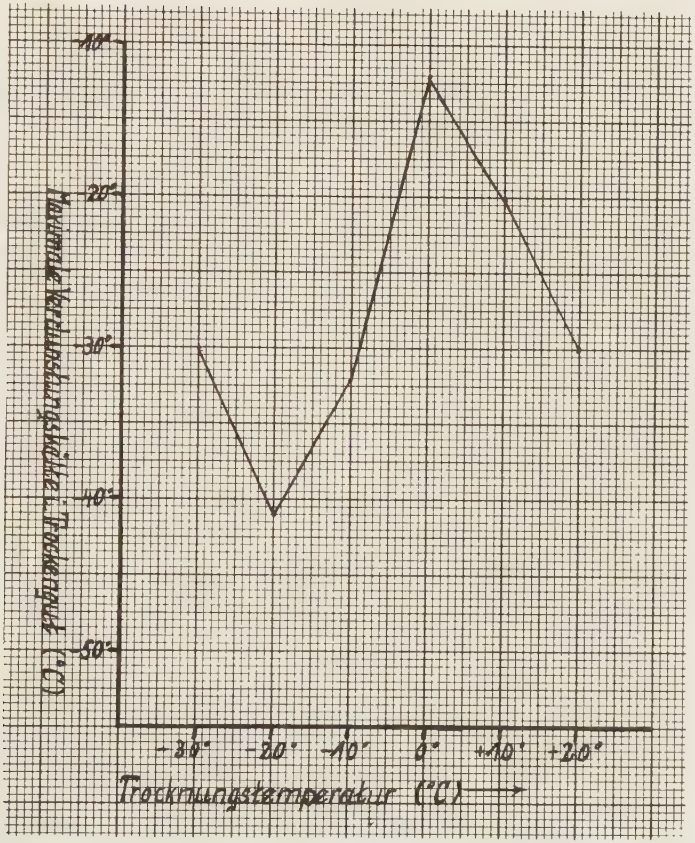

Abb. 7
Maximalwerte der Verdunstungskälte bei
den verschiedenen Trocknungstemperaturen

Die Geschwindigkeit des Wärmeeinstroms in die Ampulle und in das Trockengut wird für den Verlauf der Temperaturkurve während der Verdunstungsphase von Bedeutung sein. Aus Abb. 6 läßt sich folgendes entnehmen: Der Wasserentzug aus dem Trockengut bei Trocknungstemperaturen zwischen + 20° und - 20° C erfolgt so schnell, daß die Geschwindigkeit des Wärmeeinstroms aus der Umgebung nicht ausreicht, um die entstehende Verdunstungskälte auszugleichen. Anders liegt jedoch der Fall bei einer Trocknungstemperatur von - 30° C: hier scheint der Wasserdampfentzug bereits so langsam zu erfolgen, daß es zu einem Ausgleich zwischen Wärmeabgabe aus dem Trockengut und

Wärmeeinstrom aus der Umgebung kommt und ein Temperaturabfall als sichtbares Zeichen der Verdunstug nicht erfolgt.

b) Druckverlauf

Der Druckverlauf im System der Gefriertrocknungsanlage in unmittelbarer Nähe des Trockengutes ist aus Abb. 8 zu entnehmen.

c) Geschwindigkeit des Wasserentzuges aus dem Trockengut

Die Verdunstungskälte stellt einen Maßstab für den Wasserdampfpartialdruck über dem Trockengut dar, und dieser wiederum ist ein Maß für den Abtransport des gebildeten Wasserdampfes. Der Abtransport des Wasserdampfes läßt sich nach der Gleichung von Knudsen berechnen (Neumann 1955):

$$Q = \frac{4}{3} \cdot \frac{2\ M}{R \cdot T} \cdot \frac{r^3}{L} \cdot (p_a - p_b)$$

Q = Menge des abtransportierten Wasserdampfes in der Zeiteinheit
M = Molekulargewicht des Wassers
R = Gaskonstante = $8{,}313 \cdot 10^7$ $\frac{erg}{grad}$
r = Radius des Röhrensystems
L = Länge des Röhrensystems
Pa = Wasserdampfpartialdruck über dem Trockengut
p_b = Wasserdampfpartialdruck in der Kühlfalle
T = absolute Temperatur

Diese Gleichung ist als Berechnungsgrundlage gedacht, wenn im Hochvakuumbereich - also bei 10^{-3} bis 10^{-6} Torr - gearbeitet wird. Für den Bereich des Feinvakuums - also von 10^{-1} bis 10^{-3} Torr - scheinen die mathematischen Grundlagen zur Berechnung der Menge des abtransportierten Wasserdampfes noch etwas unsicher zu sein. Da in unserem Falle das Hochvakuum nahezu erreicht war, wurden die Berechnungen nach der Knudsen-Gleichung gemacht. Die Menge des abtransportierten Wasserdampfes in der Zeiteinheit wurde für den Augenblick berechnet, in dem die Verdunstungskälte im Trockengut ihr Maximum erreicht hatte. Die Wasserdampfpartialdrucke bei den verschiedenen Temperaturen sind aus der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

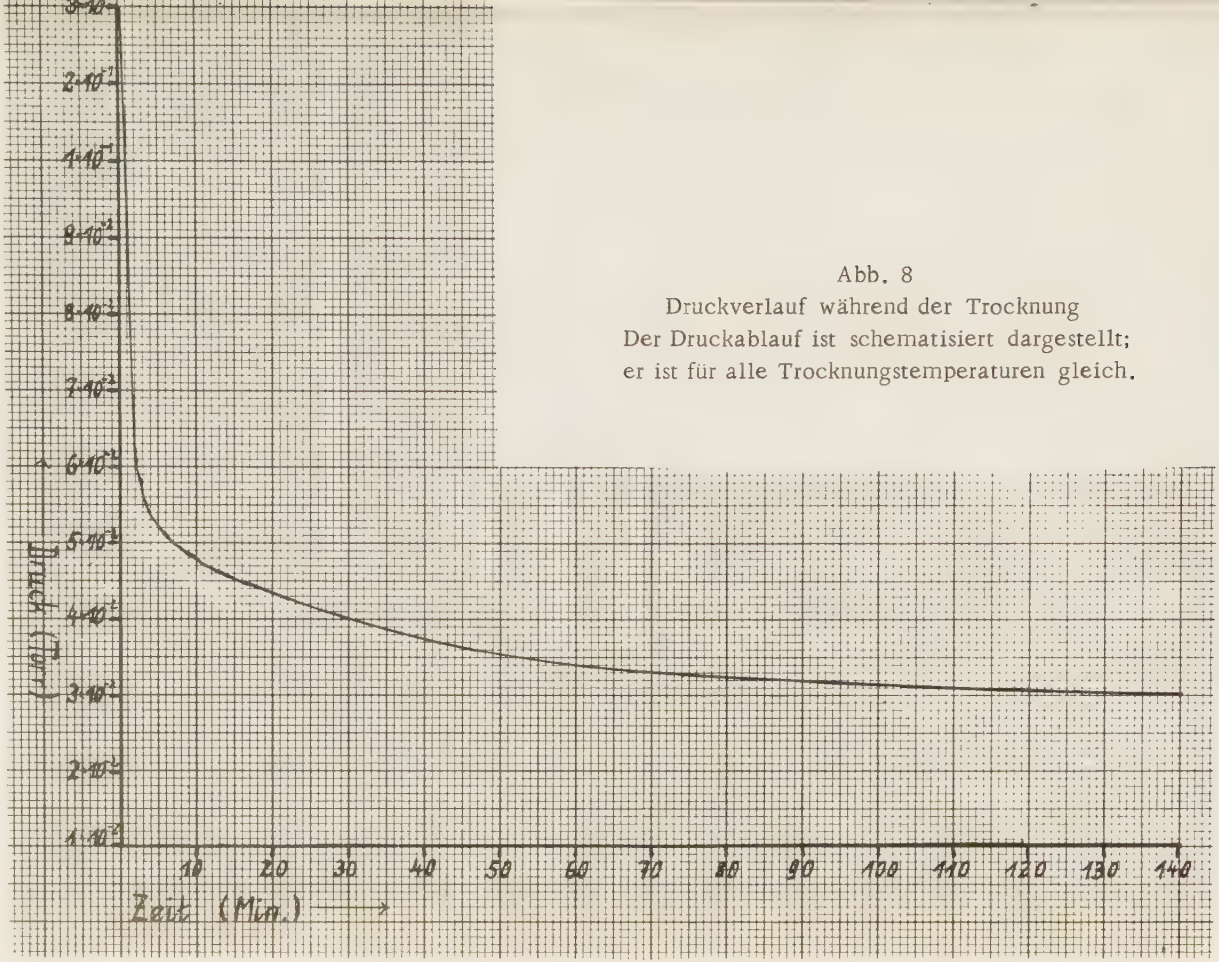

Abb. 8
Druckverlauf während der Trocknung
Der Druckablauf ist schematisiert dargestellt;
er ist für alle Trocknungstemperaturen gleich.

Temperatur	Wasserdampfpartialdruck (Torr)
- 50° C	0,029
- 40° C	0,094
- 30° C	0,280
- 20° C	0,770
- 10° C	1,947
- 1° C	4,215
0° C	4,579
+ 10° C	9,200
+ 20° C	17,500

In Abb. 9 sind die Höchstwerte der Verdunstungskälte bei den verschiedenen Trocknungstemperaturen sowie die Menge des dabei abtransportierten Wasserdampfes in einer Sekunde dargestellt. Die genauen Zahlenwerte sind aus nachstehender Tabelle ersichtlich:

Temperatur	Menge d. abtransp. Wasserdampfes
- 40° C	$0{,}118 \cdot 10^{-3}$ g
- 30° C	$0{,}345 \cdot 10^{-3}$ g
- 20° C	$0{,}936 \cdot 10^{-3}$ g
- 10° C	$2{,}324 \cdot 10^{-3}$ g
0° C	$5{,}370 \cdot 10^{-3}$ g

Die Abb. 9 läßt ferner die Abhängigkeit der Überlebensraten von Trocknungstemperatur, Verdunstungskälte und Geschwindigkeit der Wasserdampfentfernung erkennen. Die Kurven II und III zeigen eine auffallend gute Übereinstimmung mit der Kurve I, welche die Keimverluste darstellt.

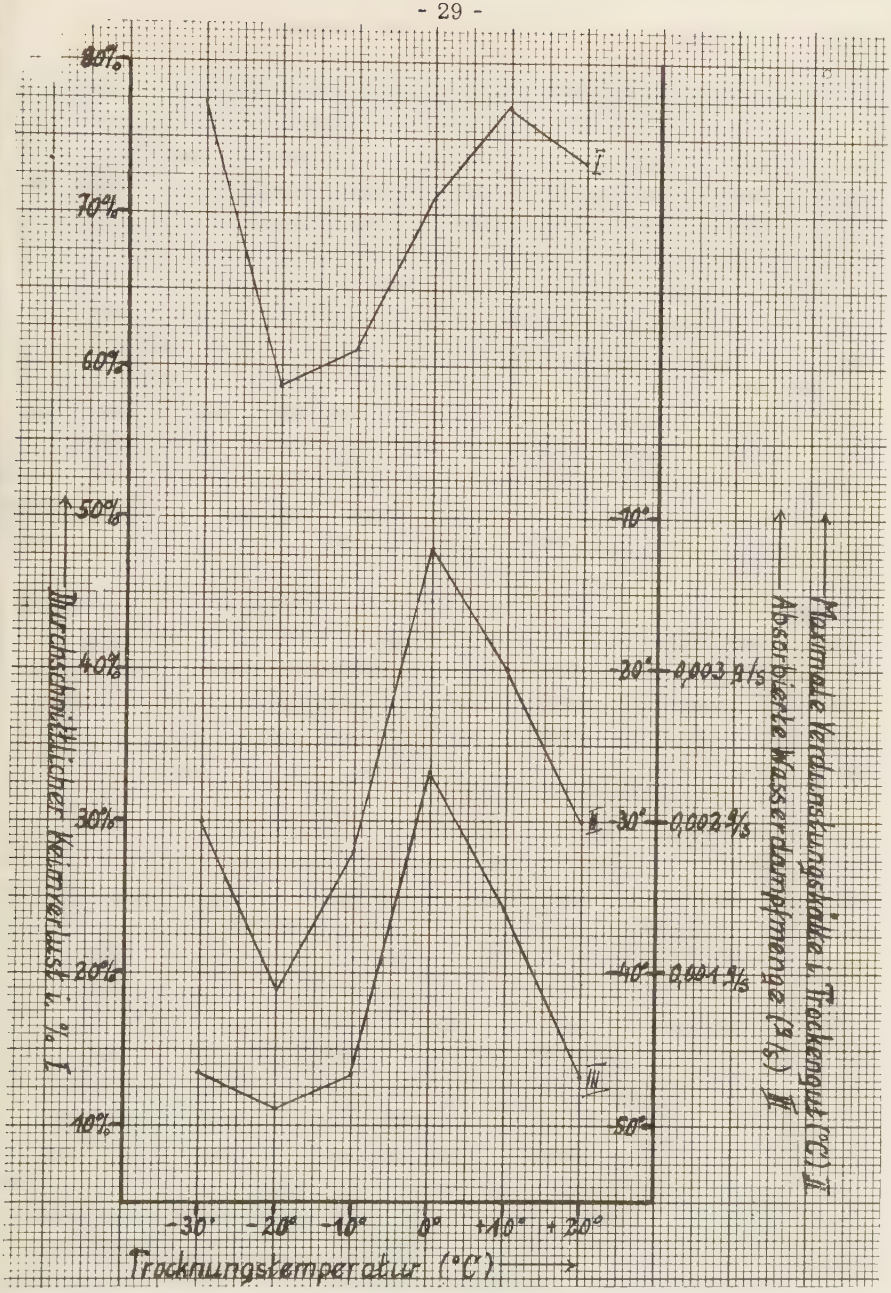

Abb. 9

Zusammenhang zwischen Absterberate der Keime (I), abtransportierter Wasserdampfmenge/Sekunde (III) und maximaler Verdunstungskälte (II) in Abhängigkeit von der Trocknungstemperatur

V DISKUSSION

Die Verschiedenheit der physikalischen Vorgänge verlangt eine gesonderte Betrachtung der beiden Abschnitte "Einfrieren" und "Trocknen". Das Einfrieren der Keime geschieht heute grundsätzlich mit Schutzlösungen, denn es ist erwiesen, daß sie dann den Prozeß besser überstehen als z. B. nach Einfrieren in wäßriger Lösung. Über die physikalischen Vorgänge, die sich beim Einfrieren mit Schutzlösungen in der Suspension abspielen, gehen allerdings die Ansichten der Autoren noch weit auseinander. Die Resultate der einzelnen Untersucher weichen stark voneinander ab, denn es wurden sowohl mit der langsamen als auch mit der mittelschnellen und extrem schnellen Einfriermethode bei der Verwendung von Schutzlösungen optimale Ergebnisse erzielt. (Mazur, Rhian und Mahlandt 1957, Luyet 1952.) Eine einleuchtende Erklärung für solche Differenzen könnte die Arbeit von Weiser und Osterud (1945) geben. Nach ihrer Ansicht richtet sich die Einfriergeschwindigkeit nach dem eutektischen Punkt der Schutzlösung. Wählt man Einfriertemperaturen unterhalb des eutektischen Punktes, so kann keine Veränderung des osmotischen Druckes erfolgen, die zur Schädigung der Bakterienzelle führen würde; folglich sind die Überlebensraten höher. Dementsprechend erwartet man bei einer kurvenmäßigen Darstellung der Überlebensraten einen Kurvenanstieg, sobald sich die Einfriertemperatur dem eutektischen Punkt nähert oder ihn unterschreitet.

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Vermutung nicht. Vielmehr zeigt die Kurve der Überlebensraten bei den verschiedenen Einfriertemperaturen zwei Maxima, von denen das höhere bei - 25° C und das andere, etwas niedrigere, bei - 80° C liegt. Das Einfrieren bei - 10° C und - 20° C sowie bei Temperaturen im Bereich von - 35° bis - 70° C führt zu deutlich geringeren Überlebensraten. Beim Einfrieren in diesen Temperaturbereichen müssen sich demnach in der Bakterienaufschwemmung Vorgänge abspielen, die zur Zellschädigung führen. Wenn auch die Ergebnisse von Weiser und Osterud es wahrscheinlich machen, daß der eutektische Punkt des Suspensionsmediums für die Abhängigkeit der Überlebensraten von der Einfriertemperatur von Bedeutung ist, so muß doch berücksichtigt werden, daß es schwierig ist, über den eutektischen Punkt eines derartig komplizierten Gemisches etwas auszusagen. Welche Faktoren für den höheren Keimverlust bei - 10° und - 20° C sowie zwischen - 35° und - 70° C maßgebend sind, bzw. welche Konstellation jene Faktoren haben müssen, um zu den günstigen Überlebensraten wie bei - 25° und - 80° C zu führen, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht entnommen werden.

Die Vermutung, daß das Verhalten von Keimen aus einer wachsenden Kultur gegenüber Abkühlung auf 0^{o} C (wie bei Hegarty und Weeks beschrieben) auch für den Einfrierprozeß gilt, hat sich bestätigt. Keime aus einer wachsenden Kultur sind gegenüber Einfrieren bei allen verwendeten Temperaturen sehr empfindlich, wenn sich die Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase befindet. Eine optimale Einfriertemperatur wurde in diesem Fall nicht gefunden.

Diese Beziehungen werden noch deutlicher durch das Verhalten von Keimen aus einer synchronisierten Kultur gegenüber dem Einfriervorgang bei - 25^{o} C. Bakterienzellen mit regem Proteinstoffwechsel vertragen den Einfriervorgang sehr schlecht - im Gegensatz zu Bakterienzellen kurz vor, während und kurz nach der Teilung, wo die Proteinsynthese vermindert ist (Lark 1961).

Die unterschiedlichen Überlebensraten, die sich beim Auftauen bei verschiedenen Temperaturen ergeben haben, lassen erkennen, daß auch bei diesem Vorgang mit Keimverlusten gerechnet werden muß. Die graphische Darstellung ergibt ein Optimum bei etwa + 30^{o} C. Bei tieferen und höheren Auftautemperaturen fällt die Überlebensrate wieder ab. Wie bereits angedeutet, wird das effektive Auftau-Optimum etwas unter + 30^{o} C liegen, weil eine nicht ohne weiteres meßbare Wärmemenge von dem Aluminiumröhrchen aufgenommen worden ist, in welchem sich die eingefrorene Keimaufschwemmung befand.

Durch die Untersuchungen über den Trocknungsprozeß konnten enge Zusammenhänge zwischen dem Keimverlust und den physikalischen Bedingungen, die die Geschwindigkeit des Wasserdampfentzuges bestimmen, festgestellt werden. Eine dauernde Temperaturkontrolle direkt im Trockengut machte es möglich, ein Bild über den Temperaturverlauf während der Trocknung zu gewinnen und mit diesen Werten Rückschlüsse auf die Menge des in der Zeiteinheit entfernten Wasserdampfes zu ziehen. Dabei ergab sich (Abb. 9), daß der Keimverlust der Geschwindigkeit des Wasserdampfentzuges direkt proportional ist. Der geringste Keimverlust fand sich bei einer Kühlung des Trockengutes mit einer Kühlmischung von - 20^{o} C. Gleichzeitig wird bei dieser Temperatur eine maximale Verdunstungskälte von - 40^{o} C im Trockengut erreicht. Es kommt also offenbar darauf an, das Wasser aus dem Trockengut sehr langsam zu entfernen. - Man möchte annehmen, daß man durch eine Trocknungstemperatur unter - 20^{o} C die Bedingungen noch günstiger gestalten könnte. Dabei ist aber zu bedenken, daß die Differenz der Wasserdampfpartialdrucke zwischen Trockengut und Kühlfalle relativ gering und dadurch wiederum die Trockenzeit länger wird. Außerdem wird infolge des geringen Druckgefälles zur Kühlfalle der Wasserdampfabtransport so stark verlangsamt, daß der Wärmeeinstrom aus der Umgebung zum Ausgleich der Verdunstungs-

kälte ausreicht (vgl. S. 25).

Zum Beispiel: Bei einer Trocknungstemperatur von - 20° C wird eine Verdunstungskälte von etwa - 40°C und damit eine entsprechende Verlangsamung des Wasserentzuges erreicht. Im Gegensatz dazu sinkt bei einer Trocknungstemperatur von - 30° C infolge des Temperaturausgleiches mit der Umgebung die Verdunstungskälte nicht unter - 30° C (Abb. 9); dadurch wird also eine weitere wünschenswerte Verlangsamung des Wasserdampfabtransportes nicht mehr erreicht.

Es empfiehlt sich nicht, für die Kühlfalle eine wärmere Temperatur zu wählen, um einen langsameren Abtransport von Wasserdampf zu erreichen. Denn infolge des höheren Wasserdampfpartialdruckes in der Kühlfalle kann Wasserdampf von dort in die rotierende Pumpe gelangen und durch Emulgierung das Pumpenöl unbrauchbar machen. - Aus Abb. 9 ist außerdem ersichtlich, daß bei Trocknungstemperaturen unter - 20° C der Keimverlust wieder größer wird. - Eine Erklärung für die größere Anzahl Überlebender bei langsamem Wasserdampfabtransport kann nicht gegeben werden.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen über die Abhängigkeit der Überlebensraten von den physikalischen Bedingungen bei der Gefriertrocknung ergaben: Bakterienzellen in Stoffwechselruhe, d.h. entweder in stationärer Phase oder kurz vor, während oder kurz nach einer Zellteilung, überstehen mit weit größerer Wahrscheinlichkeit den Einfrierprozeß als solche im Zustand erhöhter Stoffwechselaktivität. Escherichia coli in Stoffwechselruhe verträgt das Einfrieren unter den angewandten Versuchsbedingungen am besten bei - 25° oder bei - 80° C; in dem dazwischen liegenden Temperaturbereich ist der Keimverlust wesentlich größer.

Die Bedeutung der Auftautemperatur für das eingefrorene Material wurde gleichfalls untersucht. Die beste Überlebensrate resultierte beim Auftauen bei +30° C. Es ist wahrscheinlich, daß die wirkliche optimale Auftautemperatur etwas unter + 30° C liegt.

Bei der Untersuchung des Trocknungsprozesses konnte eine direkte Abhängigkeit des Keimverlustes von der Geschwindigkeit des Wasserdampfabtransportes festgestellt werden. Die günstigsten Bedingungen scheinen bei einer Trocknungstemperatur von - 20° C zu liegen, bei der im Trockengut eine Verdunstungskälte von - 40° C erreicht wurde. Die durchschnittliche Überlebensrate betrug dann 41 %.

VII LITERATURVERZEICHNIS

(1) Bergmann, E.D., Halleck, F.E., Mechalas, B.J., Tenney, R.J., Characteristics of a factor, protecting the viability of lyophilized Brucella abortus cells (J. Bact., 74,101-105 (1957))

(2) Feldmann, Sigrid, Die biologischen Eigenschaften von Bakterien nach Trocknung und Gefriertrocknung (Zbl. Bakt. I, Orig., 176,572 (1959))

(3) Frasquelle, R. und Barbier, P., Quelques exemples de conservation de la vitalité des virus et des bacteries par la desiccation sous congelation (C.r.Soc.Biol., 144,1618 (1950))

(4) Fry, R.M. und Greaves, R.J.N., The survival of bacteria after drying (J. Hyg. (Camb.), 49,2-3 (1951))

(5) Glover, R.E., The effects of a) freeze-drying and b) low temperature on the viability of Mycobacterium tuberculosis (J.Path., 58/3, (1946))

(6) Harrison, jr., A.P., Survival of bacteria upon repeated freezing and thawing (J. Bact., 70,711-715 (1955))

(7) Heckly, R.J., Anderson, A.W. und Rockenmacher, M., Lyophilization of Pasteurella pestis (Appl. Microbiol., 6,255-261(1958))

(8) Hegarty, C.P. und Weeks, O.B., Sensitivity of E. coli to coldshock during the logarithmic growth-phase (J. Bact., 39,475 (1940))

(9) Hörter, R., Überlebensraten von Bakterien nach der Hochvakuum-gefriertrocknung (Zbl. Bakt. I, Orig., 171,526 (1957))

(10) Jacherts, D., Über die Synchronisation von Bakterienkulturen (Zeitschr. Hyg., 145,286-292 (1958))

(11) Lark, K.G., Variation in bacterial acid-soluble desoxyribotides during discontinuous desoxyribonucleic acid synthesis (Biochem. Biophys. Acta 51,107 (1961))

(12) Macfadyen, A. und Rowland, S., Upon the intracellular constituents of the Typhoid Bacillus (Zbl. Bakt. I, Orig., 30,753 (1901))

(13) Major, C.P., Mc Dougal, J.D., Harrison Jr., A.P., The effect of the initial cell concentration upon survival of bacteria at - 22° C (J. Bact. 69,244 (1955))

(14) Mazur, P., Rhian, A.M., Mahlandt, G.B., Survival of Pasteurella tularensis in sugar solution after cooling and warming at subzero temperature (J. Bact. 73,394 (1957))

(15) Meyer, J., Über die Einwirkung flüssiger Luft auf Bakterien (Zbl. Bakt. I, Orig., 28,594 (1900))

(16) Moreau, M., Recherches sur la lyophilisation des anaerobies (Ann. Inst. Pasteur 83,367 (1952))

(17) Neumann, Karlheinz, Grundriß der Gefriertrocknung (2. Aufl. 1955, Musterschmidt Wissenschaftlicher Verlag Göttingen-Frankfurt-Berlin)

(18) Park, W.H., a) Duration of life of Typhoid Bacilli, derived from 20 different sources in ice. b) Effect of intense cold on bacteria (Zbl. Bakt. I, Ref., 29,4444 (1901))

(19) Ravanel, M.P., The resistance of bacteria to cold (Zbl. Bakt. I, Orig., 28,751 (1900))

(20) Record, B.R. und Taylor, R., Some factors influencing the survival of B. coli on freeze-drying (J. Gen. Microbiol. 9/3,475-484 (1953))

(21) Stavitsky, A.B., Preservation of Leptospira icterohaemorrhagiae in vitro (J. Bact. 50,118 (1945))

(22) Stillmann, E.G., The preservation of Pneumococcus by freezing and drying (J. Bact. 42,689 (1941))

(23) Wassermann, A.E. und Hopkins, W.J., Studies on the recovery of viable cells of freeze-dried Serratia marcescens (Appl. Microbiol. 5,295 (1957))

(24) Weiser, R.S. und Osterud, C.M., Studies on the death of bacteria at low temperatures (J. Bact. 50,413 (1945))

Zum Abschluß möchte ich Herrn Professor Dr. R.-E. Bader, dem Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Tübingen, für die Überlassung des Themas und Herrn Dozent Dr. D. Jacherts für die entgegenkommende Beratung meinen ergebensten Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 13. Mai 1936 wurde ich, Hannelore Siebold, als erste Tochter des Kaufmannes Gerhard Siebold und seiner Ehefrau Elfriede, geborene Hesse, in Leipzig geboren.

1951 verließ unsere Familie die Ostzone, um sich in Murrhardt/Württemberg neu anzusiedeln. Dort absolvierte ich das Progymnasium und anschließend das Gymnasium in Backnang. Hier bestand ich im Februar 1956 die Reifeprüfung.

Im gleichen Jahr begann ich das Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, wo ich auch 1958 die Ärztliche Vorprüfung ablegte, Nach einsemestrigem Studium an der Universität Kiel kehrte ich nach Tübingen zurück. Dort bestand ich 1961 die Ärztliche Prüfung.

Am 1. Januar 1962 begann ich meine Medizinalassistentenzeit auf der Geburtshilflich-Gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Backnang. Vom 1. November 1962 bis 30. April 1963 arbeitete ich auf der Internen Abteilung des Hauses. Seit 1. Mai 1963 bin ich auf der Chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Kempten als Medizinalassistentin tätig.